

## ヒト胎児肝における Urea Cycle Enzyme に関する研究

中 村 キ ミ エ

札幌医科大学小児科学講座 (主任 中尾亨教授)

### Studies on Urea Cycle Enzyme in Human Foetal Livers

Kimie NAKAMURA

*Department of Pediatrics, Sapporo Medical College  
(Chief: Prof. T. Nakao)*

The urea synthesizing enzymes of human liver tissues, namely, carbamylphosphate synthetase (CPS), ornithine transcarbamylase (OCT), argininosuccinic acid synthetase (ASS), argininosuccinase (ASase), arginase (Arg), have been measured between prenatal and postnatal period.

Furthermore, the concentrations of protein, free amino acids of these samples were measured by the use of an automatic amino acid analyser and the relation between urea-synthesizing enzyme activities and the free amino acids was examined. Specimens from 70 autopsied human livers obtained from fetuses, premature infants, newborn infants, infants, children and adults were examined.

The results were as follows:

1) The mean of activities of urea synthesizing enzymes showed a increased pattern for OCT, Arg, at foetal life, whereas those of CPS, ASS and ASase of foetal livers showed no significant difference in each stage. Except for Arg, other four enzyme activities were higher in the postnatal than those in the foetal life. Arginase activities indicated maximal increase at a gestational age between 28-31 weeks and decreased in the postnatal life.

2) The relative activities of the four enzymes were expressed on the basis of ASS. In the foetal life, the value of four relative activities showed significantly increased pattern, but in the postnatal life, those were constant or slightly decreased pattern.

3) The degree of urea-synthesizing enzyme activities in each stage was expressed as percent of the value measured in children. All five enzyme activities were present in 30% or more of those of children even at a gestational age between 12-19 weeks. From these results, it was deduced that urea synthesized by themselves in early foetal stages.

4) There has been no significant difference in the concentrations of total protein and free amino acids between foetal and postnatal liver tissues. The ratio of essential amino acids to total free amino acids was slightly greater in the postnatal liver.

5) As concerned with a component of the free amino acids in the liver tissues, glutamine, glutamic acid, glycine and taurine accounted for 50-60% of the total amino acids in the foetal livers, while, glutamine, glutamic acid, glycine and alanine occupied 45-50% of the total amino acids postnatally. Moreover, concentrations of taurine, serine and threonine were significantly higher in the foetal tissues, whereas those of methionine and alanine were rather lower.

6) The relation between urea synthesizing enzyme activities and the free amino acids was examined. In the foetal life, urea synthesizing enzyme activities were low, however, the concentrations of free amino acids in the liver were not necessarily high. The ratios of the amino acids concerned with urea cycle substrates (aspartic acid, glutamic acid, ornithine) showed no significant difference as compared with other free amino acids. It was thought that ammonia detoxications have been done sufficiently with those low enzyme activities.

(Received August 13, 1977 and accepted September 29, 1977)

## 緒 言

生体内、アミノ酸、蛋白代謝の dynamic な流れの中でアミノ酸の主要成分窒素も常に移動している。種々のアミノ酸分解経路のうち特に脱アミノ反応では、多量の有毒なアンモニアが生じてくるが、ヒトにおいては、その大部分が尿素への生合成により、すみやかに解毒排泄される。すでに成長の停った成熟個体であっても、一定量のアミノ酸、タンパク質の補給が必要であり、摂取した量にほぼ等しい窒素が主に尿素として排出されている。尿素合成の経路すなわち ornithine urea cycle (Krebs-Henseleite) では1回転ごとに2分子のアンモニアと1分子の炭酸ガスから、1分子の尿素が合成される。尿素合成の場合は、主として肝であるが、一部は腎、脳、赤血球、線維芽細胞等で行われていることが知られている<sup>1-3)</sup>。今回 urea cycle enzyme として、尿素合成に直接関与する5つの酵素活性について、胎児期から学童に至るまでの系統的な活性測定を行い、ヒト発達段階の一つの指標としての基礎的データを求めた。さらに、胎児期と出生後での酵素の相対的活性パターンの差異の有無、および胎児期の尿素生成、および排出の時期につき検討を行い、合わせて肝組織内に存在する遊離アミノ酸総量、および必須アミノ酸量を求め、尿素合成酵素群の活性結果との関連性、および肝組織内遊離アミノ酸組成の胎児期特徴につき検討し、2~3の新知見を得たので報告する。

## A. 研究材料

urea cycle の酵素活性の測定およびアミノ酸組成は、ヒト胎児肝と剖検肝で行った。1975年1月より1977年1月まで札幌市内の産院で法的手続を得た上で人工妊娠中絶が行われた在胎12週から31週までの肝36例、および札幌医大小児科、札幌市立病院小児科、青森県立中央病院小児科入院死亡の未熟児剖検7例、加えて1974年7月より1977年1月までの間に札幌医大小児科入院死亡の新生児、乳児、幼児、学童の剖検例24例である。さらに成人剖検肝は、北大第一病理より得られた3例を用いた。材料は原則として死後4時間以内に採取した。また活性測定まで $-70^{\circ}\text{C}$ に保存したが、保存期間による活性値低下の有無を考慮し、同一検体につき1カ月、6カ月、1年と活性を測定し、誤差範囲内の変動を認めるのみであり、保存による活性値の低下はないものと考えた。また、新生児1例、未熟児1例に死後11時間経過後の材料が含まれているが、その活性値は死後4時間内採取群と比較して酵素活性に低下が認められなかったためそのまま採用した。尚、胎児月齢は月経胎齢を採用し、在胎期間を基準に4つの群に分類した。

各群の例数は在胎12週から19週以内10例、20週以上23週以内10例、24週以上27週以内10例、28週以上32週以内6例でいずれも人工妊娠中絶時、母体に異常は認められなかった。出生後の分類は便宜上、未熟児を1群とし、出生後1カ月未満を新生児、1カ月以上1歳未満を乳児、1歳以上最高9歳までを幼児、学童としてまとめ、成人と合わせて5群に分類した。剖検肝はいずれも入院時および入院経過中臨床的に肝障害がなく、また、病理学的に肝に病変を認めず、代謝異常のないと考えられるものでステロイドの使用もない。また、アミノ酸自動分析には量的に充分量採取されたもののみにについて行った。分析し得た例数は、在胎12週~19週以内4例、在胎20週~23週以内6例、在胎24週~27週以内5例、在胎28週~31週以内6例、未熟児4例、新生児8例、乳児5例、幼児・学童3例、成人例3例である。

## B. 実験方法

### 1) urea cycle 酵素活性について

#### (1) 酵素剤の調整

基質に用いた酵素剤は ornithine transcarbamylase (以下 OCT と略す) を除き、すべて市販 (Sigma Chemical Co.) のものを用い、carbamyl phosphate synthetase (以下 CPS と略す) 活性測定に必要な OCT は牛肝より Burnett and Cohen<sup>4-7)</sup> の方法を用いて分離精製した。操作は、屠殺後1時間以内の牛肝より氷冷の下に抽出操作を行った。牛肝400gから、線維部分を除き、ハサミで細切し、その300gに0.9M冷KCl溶液900mlを加え、45秒間 Waring blender でホモジナイズした。牛肝ホモジネートをチーズクロスで濾過し、 $0^{\circ}\text{C}$  7,000 $\times$ g、45分間遠沈した。沈渣に0.9M冷KCl 1lを加え、懸濁し、再び7,000 $\times$ g 20分間遠沈した(1回目の洗い)。再度、この操作をくり返し(2回目の洗い)、沈渣を $-20^{\circ}\text{C}$ 冷アセトン液、約3~4l中に充分攪拌しながら滴下し、45秒間更に攪拌し、吸引濾過する。このときの収量は約60gであった。このアセトン粉末を2分し、アセトン粉末、各々30gに対し、冷再蒸留水5倍量を加え、30分間静置、再度この操作を行い、30分静置後、4,000 $\times$ g、15分間遠沈し、残渣は捨て各々抽出後の上清600mlを $60^{\circ}\text{C}$  20分間温浴、 $0^{\circ}\text{C}$ に冷却後、硫酸アンモニウムを加え、2.5M~3.2Mでの沈澱分画を遠沈にて集め、0.1Mトリス緩衝液各5mlで溶解し $-70^{\circ}\text{C}$ に保存した。尚、0.1ml中のOCTは約450単位であった。

#### (2) 肝ホモジネート液の調整

##### a) Schimke 法<sup>9)</sup>

OCT, arginase (以下 Arg と略す) 測定に用いた方法で、肝組織約20mgを秤量し、19倍量の氷冷脱イオン水

を加え、1分間ホモジネートしそのまま反応に用いた。

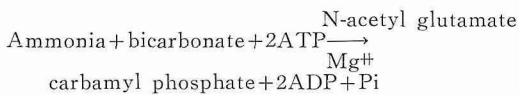
#### b) Brown and Cohen<sup>8)</sup> 法

CPS, argininosuccinic acid synthetase (以下 ASS と略す) および argininosuccinate cleavage enzyme (以下 ASase と略す) 測定の方法で、肝組織、約 1 g に 0.1% cetyltrimethylammonium bromide (以下 CTB と略す) 9 倍量加え、約 2 分間ホモジネートし、4°C, 4,000×g, 15 分間遠沈し、上清 (S<sub>1</sub> とする) における活性を測定した。CPS 測定の原法は、上記沈渣にさらに同量の 0.1% CTB を加えて攪拌後、遠沈し、その上清 (S<sub>2</sub> とする) に上記上清 S<sub>1</sub> を加えて用いるのであるが、著者は測定感度をあげるため、S<sub>1</sub> 分画をさらに超音波 (10 kHz, 1 分間) 処理し、細胞破碎により、ミトコンドリア部分に存在する酵素の遊離をはかり測定に用いた。

#### (3) 尿素サイクル5つの酵素活性測定方法<sup>8,9)</sup>

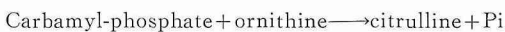
酵素活性測定方法は Schimke 法と Brown and Cohen 法の 2 法を用いた。5 つの酵素のうち OCT および Arg 活性は Schimke 法を CPS, ASS および ASase は Schimke 法によるバラツキが大きいため Brown and Cohen 法を用いた。

#### a) CPS 測定法



CPS は上記反応を触媒するが、本酵素に充分量の ornithine と OCT (牛肝より精製) を同時に反応させ、生じた citrulline 量を S. Ratner の法<sup>10)</sup> により比色定量した。assay medium は 50 μ moles ammonium bicarbonate, 5 μ moles ATP, 5 μ moles L-ornithine, 5 μ moles N-acetyl L-glutamate, 10 μ moles magnesium sulfate 以上 5 つの試薬を脱イオン水にて溶解 0.3 ml とし、pH 7.0 に調整し、mixture とした。使用直前に氷冷中で CO<sub>2</sub> を吹き込み pH 6.8 とした。反応は基質として OCT 0.1 ml (=75 単位に稀釈)、抽出液 0.25 ml, 脱イオン水 0.35 ml 中に mixture 0.3 ml を加えて反応を開始させ incubation time 37°C, 15 分間その後 0.5 M perchloric acid (PCA) 5 ml を加えて反応を中止させ、遠沈後の上清 3.0 ml を発色に用いた。blank は incubation 前に 0.5 M PCA 5.0 ml を加えたものを用いた。

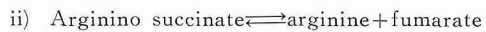
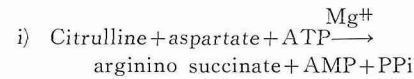
#### b) OCT 測定法



OCT は上記の反応を触媒する酵素であり S. Ratner の法<sup>10)</sup> により citrulline を定量した。assay medium は、0.05 M glycyl glycine (pH 8.0), 0.015 M L-ornithine,

0.02 M carbamyl phosphate 以上 3 種類の試薬に脱イオン水と抽出液 0.025 ml を加えて全量 1.0 ml とした。incubation time 37°C 15 分間で反応中止のため 15% PCA 2.5 ml を加え、遠沈後、上清 0.5 ml を citrulline 定量に用いた。なお、carbamyl phosphate は溶液として不安定なため、使用直前に溶解した。

#### c) ASS 測定法

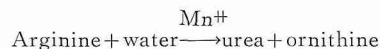


ASS は i) を触媒する condensing enzyme であり、ii) を触媒するのが cleavage enzyme である。cleavage enzyme は常に condensing enzyme より高値を示すことが証明されており<sup>8)</sup> condensing enzyme の測定には、i), ii) の両者を合わせた活性を測定した。このため、あらかじめ充分量の Arg を加え、生じた尿素を S. Ratner 法<sup>10)</sup> により定量した。assay medium は 5 μ moles magnesium sulfate, 5 μ moles ATP (pH 7.0), 5 μ moles L-citrulline (pH 7.0), 5 μ moles L-aspartate (pH 7.0), 50 μ moles potassium phosphate buffer (pH 7.0) 以上、5 つの試薬を脱イオン水で溶解し、0.5 ml とし、pH 7.0 に調整した。(あらかじめ数検体分を作製し、-18°C 保存した。) 反応は、5 つの試薬 mixture に Arg 20 単位を加え、肝抽出液 0.5 ml を加えて反応を開始させ、37°C 1 時間 incubation し、0.5 M PCA 5.0 ml にて反応を停止させ、遠沈後の上清 2.0 ml の urea を定量とした。blank は a) と同様とした。

#### d) ASase 測定法

前記 c) の ii) の反応を触媒し、assay medium は、2 μ moles argininosuccinate (pH 7.0) (協和醗酵より供与)、50 μ moles potassium phosphate buffer (pH 7.3) に充分量の Arg 20 単位と肝抽出液 0.05 ml および、脱イオン水を加えて全量 7.0 ml とした。incubation time は 37°C 15 分間、これに 0.5 M PCA 5.0 ml を加え、遠沈後の上清 10 ml 中の urea を定量した。

#### e) Arg 測定法



Arg は上記の反応を触媒し、assay medium は 0.01 M manganese sulfate, 0.25 M arginine (pH 9.7) 脱イオン水、および肝抽出液 0.02 ml を加え全量 1.0 ml とした。37°C, 10 分間 incubation し 15% PCA 2.5 ml を加えて反応を停止させ、遠沈後の上清 0.1 ml 中の urea を定量した。なお、citrulline, urea の発色法は S. Ratner の法<sup>10)</sup> を用い、また、蛋白定量には Lowry *et al.*<sup>11)</sup> の方法を用い

**Table 1 (a)** Summary of specific activities of urea cycle enzymes in human tissues ( $\mu$  moles products/mg. protein/hr)

Age	CPS		OCT		ASS		ASase		Arg	
	M $\pm$ SD	N	M $\pm$ SD	N	M $\pm$ SD	N	M $\pm$ SD	N	M $\pm$ SD	N
gestational age 12-19 weeks	0.89 $\pm$ 0.32	9	10.68 $\pm$ 3.90	9	0.28 $\pm$ 0.18	9	2.33 $\pm$ 1.42	10	47.18 $\pm$ 29.31	10
20-23	0.89 $\pm$ 0.63	10	13.60 $\pm$ 4.95	8	0.32 $\pm$ 0.19	9	2.44 $\pm$ 1.25	10	68.03 $\pm$ 35.11	10
24-27	1.26 $\pm$ 0.50	8	15.21 $\pm$ 5.90	10	0.19 $\pm$ 0.07	10	2.68 $\pm$ 1.02	10	89.51 $\pm$ 22.65	9
28-31	0.95 $\pm$ 0.41	6	15.69 $\pm$ 2.32	6	0.22 $\pm$ 0.08	6	3.09 $\pm$ 1.33	6	110.46 $\pm$ 29.96	6
premature	1.83 $\pm$ 1.53	6	18.79 $\pm$ 3.20	7	0.08 $\pm$ 0.04	4	3.71 $\pm$ 2.86	7	85.35 $\pm$ 57.37	7
newborn	2.26 $\pm$ 0.89	8	23.65 $\pm$ 9.86	8	0.33 $\pm$ 0.16	8	3.46 $\pm$ 2.92	8	47.32 $\pm$ 23.16	8
1-12 months	1.93 $\pm$ 0.39	5	30.46 $\pm$ 6.58	5	0.58 $\pm$ 0.15	5	4.41 $\pm$ 1.79	5	49.19 $\pm$ 10.09	4
1-9 years	1.59 $\pm$ 1.48	8	36.95 $\pm$ 11.85	8	0.55 $\pm$ 0.29	8	3.94 $\pm$ 1.24	8	80.33 $\pm$ 35.57	8
adult	1.15 $\pm$ 0.19	2	20.67 $\pm$ 3.08	3	0.54 $\pm$ 0.31	3	3.78 $\pm$ 1.54	3	87.37 $\pm$ 44.35	3

**Table 1 (b)** Statistical analysis by Student's *t* test

	CPS								OCT							
	20-23	24-27	28-31	Pre-mature	New-born	1-12m	1-9Y	adult	20-23	24-27	28-31	Pre-mature	New-born	1-12m	1-9Y	adult
12-19W	ND	ND	ND	ND	..	..	ND	ND	ND	ND	.	..	..	..	..	ND
20-23		ND	ND	ND	..	..	ND	ND		ND	ND	.	.	..	..	ND
24-27			ND	ND	ND	.	ND	ND			ND	ND	.	..	..	ND
28-31				ND	..	..	ND	ND				ND	ND	..	..	ND
Pre-mature					ND	ND	ND	ND					ND	..	..	ND
New-born						ND	ND	ND						ND	.	ND
1-12m							ND	ND							ND	ND
1-9Y								ND								ND

	ASS								Arg							
	20-23	24-27	28-31	Pre-mature	New-born	1-12m	1-9Y	adult	20-23	24-27	28-31	Pre-mature	New-born	1-12m	1-9Y	adult
12-19W	ND	ND	ND	ND	ND	..	ND	ND	ND	..	..	ND	ND	ND	ND	..
20-23		ND	ND	.	.	.	.	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24-27			ND	.	.	..	..	.			ND	ND	..	..	ND	ND
28-31				ND	.	.	..	.				ND	..	..	ND	ND
pre-mature					.	..	.	ND					ND	ND	ND	ND
new-born						.	ND	ND						ND	ND	ND
1-12m							ND	ND							ND	ND
1-9Y								ND								ND

ND: Indicates that there was no significant difference

..: Indicates  $p < 0.05$     . . .: Indicates  $p < 0.01$

た。各酵素活性単位は、蛋白 1 mg 当たり、1 時間に生成される citrulline または urea の  $\mu$  moles として表わした。

## II) 肝組織内遊離アミノ酸組成について

### 1) アミノ酸定量分析前処置法<sup>12)</sup>

細片肝 1 g に対し 0.15 M 冷 KCl 溶液 4 容量を加え、充分ホモジナイズし、更に超音波発生装置を用い超音波 (10 kHz, 1 分間) で細胞を破碎した。このうち 0.3 ml は蛋白定量に用いた。さらに、除蛋白のため 4% sulfosalicylic acid をホモジネート液の 3 容量加え、10 分間室温放置後 4,000×g 20 分間遠沈し、上清をアミノ酸定量分析まで -20°C に保存した。

### 2) 遊離アミノ酸定量分析

分析装置は日本電子 6AH 型アミノ酸自動分析器を用い塩基性アミノ酸分析のために、カラム 25.5 cm, 充填剤、スルホン化ポリスチレン樹脂を使用し、カラム温度、30°C, 60°C, 溶出液は Na-citrate buffer, 第 1 buffer (pH 4.30), 第 2 buffer (pH 5.10) 総分析時間 5 時間 25 分とした。中酸性アミノ酸分析条件は、カラム 45.5 cm, 充填剤は塩基性の際と同じ樹脂、カラム温度 30°C, 60°C, buffer は Li-citrate buffer を用い、第 1 buffer (pH 2.73), 第 2 buffer (pH 3.15), 第 3 buffer (pH 3.90) とした。総分析時間 8 時間 45 分の条件により分析し得た 21 種類のアミノ酸定量分析値をデジタルインテグレーターにより求めた。

## C. 実験結果

### I) 尿素サイクル酵素活性

#### 1) 尿素サイクル酵素活性測定値

在胎週数別、年代別に分けた 9 群につき 5 つの酵素活性

値の変動を求め、さらに推計学的検討を加え (Table 1 (a), 1 (b)) に示した。

#### a) CPS 活性値 (Fig. 1)

在胎 12 週より成人までの 9 つの群間の平均値の分散比 F 検定は 2.34 ( $0.01 < p < 0.05$ ) とこの分散比は意味があり、9 群に分けることにより明らかに CPS 活性値の差があることが認められた。更に各群ごとの差を t-検定した値 (Table 1 (b)) では新生児、乳児期は胎生期に比し、有意上昇を示した。幼児、学童は 8 例中 3 例が極端に低値を示したために平均値は乳児期とて差が認められなかった。未熟児例は、ばらつきが多いこと、および成人例は 2 例のため統計からはずした。

#### b) OCT 活性値 (Fig. 2)

9 つの群間での平均値の F 検定は 19.7 ( $p < 0.01$ ) と CPS の場合と同様、群間の差が認められた。さらに 2 群間の差の検定は、在胎 12 週～19 週に比し、在胎 28 週～31 週は有意に上昇し、出生後も幼児、学童期にむけ段階的な上昇を認めた。成人活性値はむしろ低下の傾向であった。

#### c) ASS 活性値 (Fig. 3)

9 つの群間の平均値の F 検定は 4.59 ( $p < 0.01$ ) と有意差が認められた。さらに 2 群間の t-検定結果では在胎 24 週から在胎 31 週までに比し、未熟児は有意の低下を示し、未熟児よりさらに、新生児、乳児は有意の上昇を認め、乳児期以降は活性に変動は認められなかった。すなわち、胎児期の活性値は変動なく、出生後に比し低く、かつ、出生後は乳児期まで段階的に活性上昇を示し、乳児以降の変動は認められなかった。

#### d) ASase 活性値 (Fig. 4)

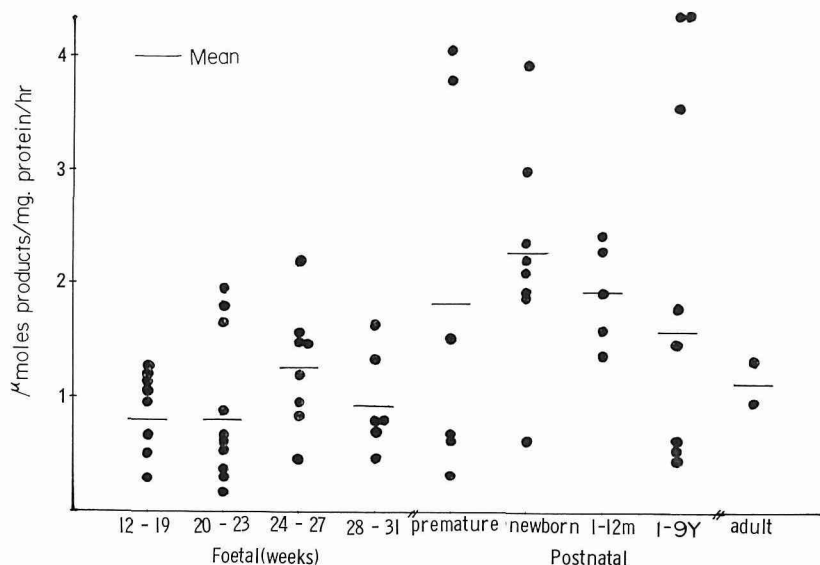


Fig. 1 Carbamyl phosphate synthetase

9つの群間の平均値のF検定は0.99 ( $p>0.05$ ) と加齢による酵素活性の有意差は認められなかった。

e) Arg 活性値 (Fig. 5)

9つの群間、平均値のF検定は2.56 ( $p<0.01$ ) で群間の有意差が認められた。さらに2群間でのt検定では胎児期は在胎12週～19週より在胎28週～31週まで、段階的活性上昇を認め、在胎28週～31週をピークに出生後は、新生

児期、乳児期と有意の活性低下を示し、乳児以降はむしろ増加傾向を示した。以上、5つの酵素のうち、ASaseは加齢による変動は全く認められなかったが、CPS, OCT, ASS活性は出生後に比し、いずれも胎児期低い値を示し、出生後はCPSが新生児期に、OCTは幼児期に、ASSは乳児期、夫々にピークを示した。Argのみは出生後より胎児期の方が活性が高く、新生児期、乳児期に最低の値を示した。

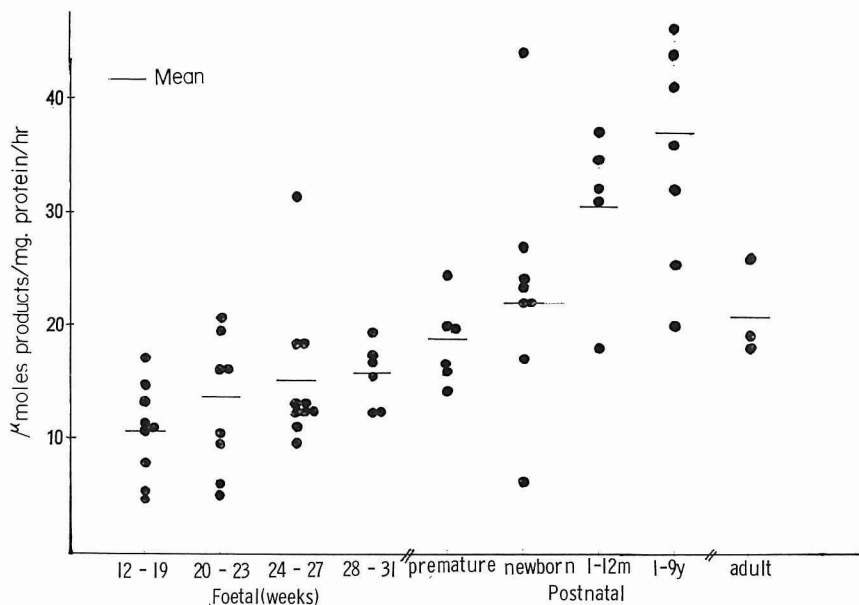


Fig. 2 Ornithine transcarbamylase

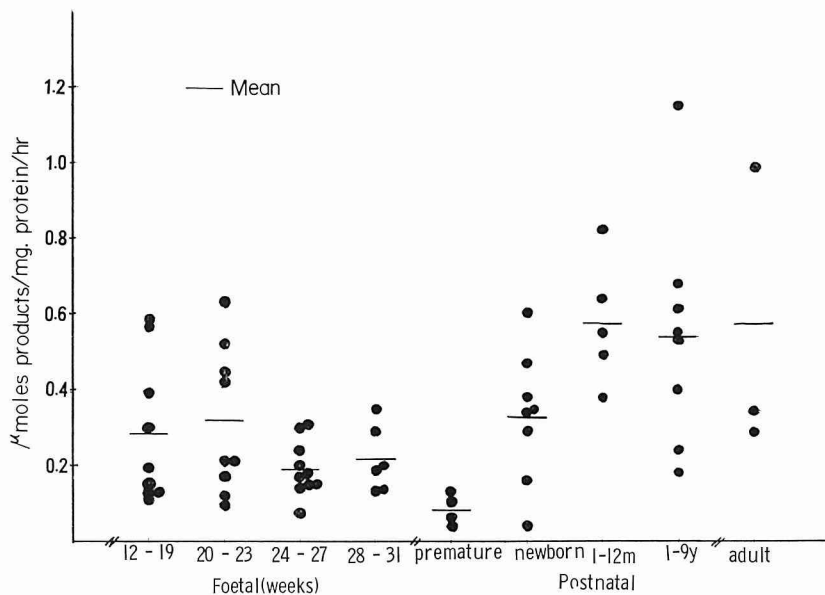


Fig. 3 Argininosuccinic acid synthetase

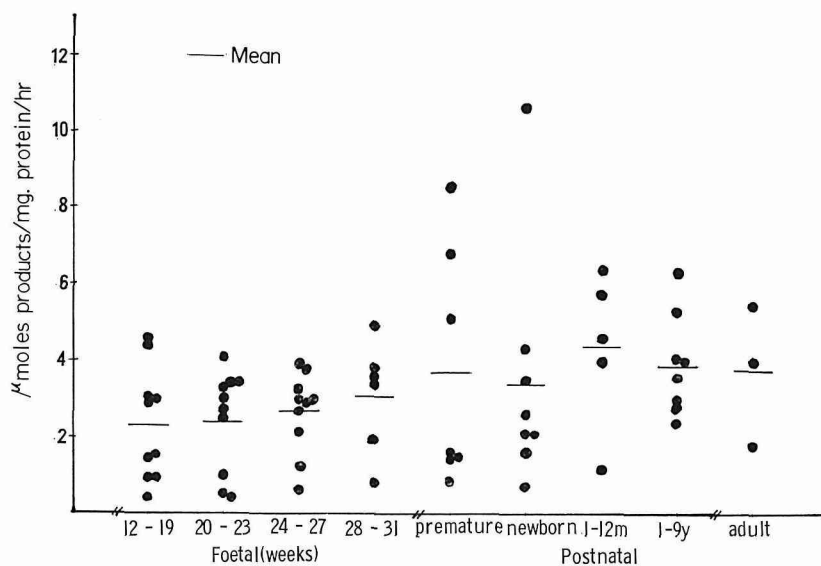


Fig. 4 Argininosuccinase

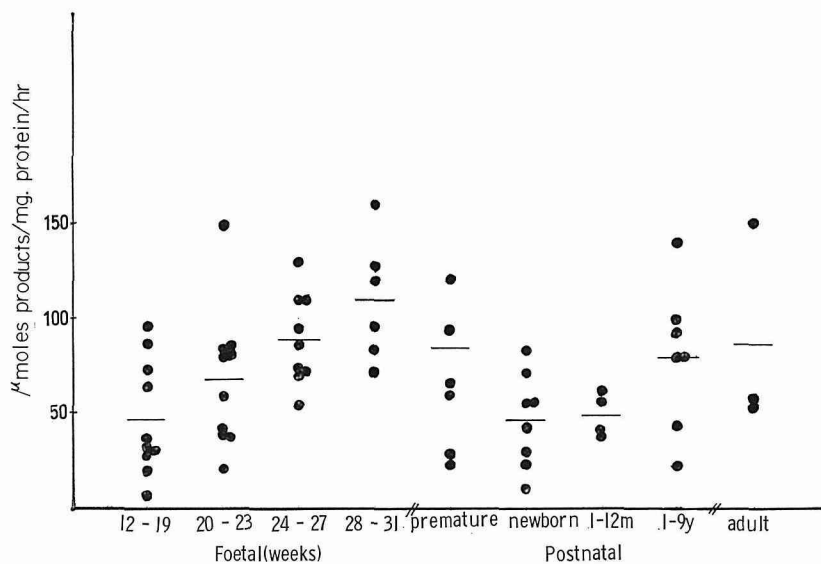


Fig. 5 Arginase

## 2) ASS を 1 とした場合の他の酵素の相対的活性の比較検討

各検体, 1 個体内尿素サイクル 5 つの酵素の回転速度を比較するため, 最大活性が一番低い値である ASS を 1 とし, 他の 4 つの酵素活性値の相対活性を求めた. (Table 2)

### a) 胎児期 (Fig. 6)

Fig. 6 は ASS を 1 としたときの各酵素比を示したもので, CPS, OCT は相対的活性に全く差が認められなかったが, 反応がすすむにつれ各胎齢共に上昇カーブを示し, 差

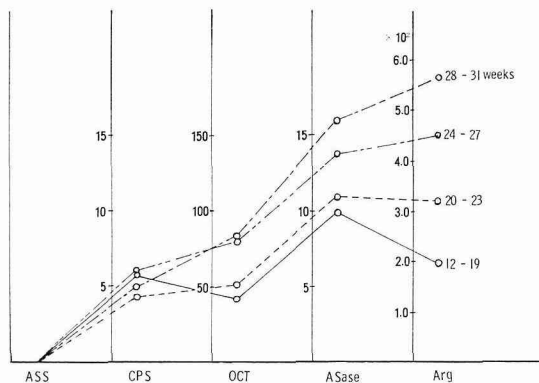
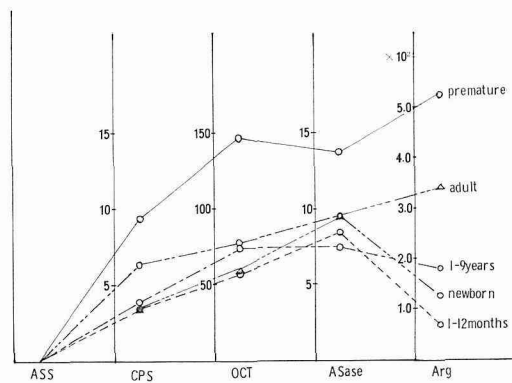
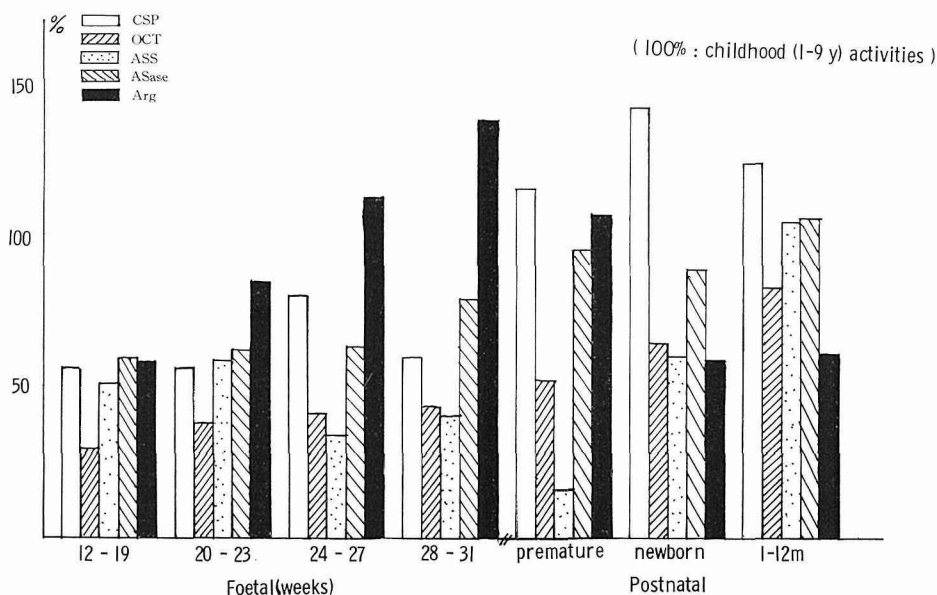
も明らかとなり, 尿素生成最終段階の Arg では在胎 12 週～19 週に比し, 在胎 28 週～31 週に明らかな有意差を認めた.

### b) 出生後 (Fig. 7)

未熟児 7 例中, 材料不足により 3 例が ASS 測定不可能であった. 1 例は CPS 測定不可能のため 3 例についてのみ検討した. 図の如く未熟児の相対的活性上昇をピークに, 新生児乳児共水平パターンを示し, Arg での相対的な活性パターンの差異が特徴的であった.

**Table 2** Summary of relative activities of urea cycle enzymes in human liver tissues

Age	Case N	CPS M ± SD	OCT M ± SD	ASS	ASase M ± SD	Arg M ± SD
gestational age 12-19 weeks	8	5.71 ± 3.63	43.07 ± 32.17	1	9.96 ± 8.38	200.15 ± 143.22
20-23	8	4.45 ± 4.85	51.13 ± 25.17	1	11.09 ± 8.31	313.66 ± 212.67
24-27	7	5.95 ± 2.52	81.31 ± 56.18	1	13.76 ± 6.18	450.91 ± 181.65
28-31	6	5.03 ± 2.93	84.33 ± 33.68	1	16.03 ± 9.71	568.12 ± 225.03
premature	3	9.46 ± 2.12	147.97 ± 100.99	1	13.60 ± 1.86	524.70 ± 320.64
newborn	7	6.39 ± 2.58	76.75 ± 50.73	1	9.37 ± 4.62	131.45 ± 66.98
1-12 months	5	3.51 ± 0.79	56.84 ± 20.89	1	8.39 ± 3.79	79.53 ± 12.74
1-9 years	7	3.75 ± 2.68	73.47 ± 36.86	1	7.50 ± 3.84	180.87 ± 147.57
adult	2	3.63	59.11	1	9.59	345.31

**Fig. 6** relative activities of urea cycle enzymes (Foetal)**Fig. 7** relative activities of urea cycle enzymes (Postnatal)**Fig. 8** changes in urea-synthesizing enzymes in human liver



### 3) 各群における5つの酵素活性の比率の検討 (Fig. 8)

本来、成人活性値を100%とし各酵素百分比を求めるが、著者は成人例が3例であり、活性値が文献的に報告されているように5つの酵素共、必ずしも高い値を示さなかったため、小児期を100%とした時の比率を求めた。図の如く在胎12週～19週すでに5つの酵素共、小児期コントロールの30%以上の値を示した。5つの酵素のうち、OCT, ASSは胎児期30～50%代であったが、Argのみは高く、在胎28週～31週でコントロールを上回る135%を示した。出生後は、未熟児を除き、新生児以降5つの酵素共60%以上の比率であり、胎児期高い比率を示したArgは60%代にとどまり、出生後はCPSの比率が高くなっているのが特徴的であった。

## II) 肝組織内蛋白量及び遊離アミノ酸定量分析値

### i) 肝組織内蛋白量 (Fig. 9)

胎児期と出生後での差は全く認められない。

### ii) 肝組織蛋白当たり遊離アミノ酸総量および必須アミノ酸総量の平均値の比較 (Fig. 10)

遊離アミノ酸総量は胎児期と出生後での差を認めない。

必須アミノ酸総量は絶対値での差はないが、アミノ酸総量に対する必須アミノ酸総量の百分比の比較では、胎児期に比し、新生児期、幼児期に高い傾向を示した。9つの群のうち、特に乳児期でのアミノ酸総量は一番低い値であった。

### iii) 肝組織内遊離アミノ酸組成およびアミノ酸総量に対する百分比

21種類の遊離アミノ酸分析結果を (Table 3) に示した。

胎児期グルタミン+グルタミン酸、グリシン、タウリンが全アミノ酸の50～60%をしめ、以下アラニン、セリン、スレオニン、リジン、プロリン、アスパラギン、ロイシンの順となり、胎生初期と末期でのアミノ酸組成および百分比は変動が認められなかった。出生後は上記アミノ酸のうち、タウリンにかわりアラニンが加わって全体の46～56%をしめた。アミノ酸総量の平均値に対する個々のアミノ酸の百分比を胎児期と出生後で比較した結果、明らかに差を認めたのは、タウリン、セリン、スレオニンが胎児期に高く、逆にメチオニン、アラニンは胎児側が低かった。

## III) 尿素サイクル5つの酵素活性値と肝組織内遊離アミノ酸定量分析値との関連性

(Fig. 11) の如く、尿素サイクルに関与する5つの酵素活

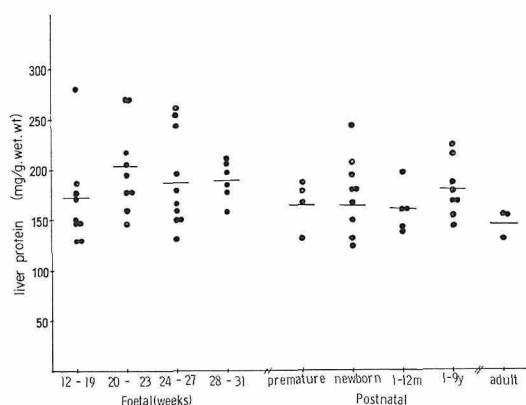


Fig. 9 protein contents of the human liver

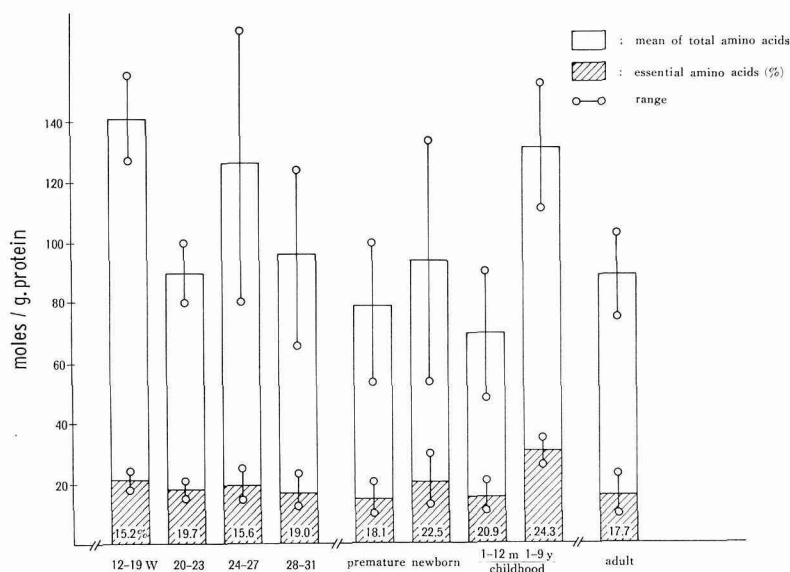


Fig. 10 total free amino acids and essential amino acids

Table 3 Component of the amino acids in human liver tissues

Age	12-19 weeks	20-23 weeks	24-27 weeks	28-31 weeks	premature	newborn	1-12 months	1-9 years	adult
Case N	4	8	6	6	4	8	5	3	3
Amino acid	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
Ornithine	2.0 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.7	2.7 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.9	3.1 $\pm$ 1.1	1.4 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.9
Lysine	4.0 $\pm$ 1.2	5.6 $\pm$ 0.6	3.6 $\pm$ 0.7	4.9 $\pm$ 1.2	5.0 $\pm$ 1.2	4.8 $\pm$ 0.6	5.6 $\pm$ 1.3	3.3 $\pm$ 1.4	4.2 $\pm$ 2.1
Histidine	1.5 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.5
Arginine	0.0 (1)	0.5 (2)	1.0 (1)	0.4 (1)	0.2 (2)	0.8 (2)	trace	0.8 (2)	0.8 (1)
Taurine	11.0 $\pm$ 5.3	9.6 $\pm$ 2.5	11.2 $\pm$ 2.1	12.3 $\pm$ 1.2	7.5 $\pm$ 2.8	5.8 $\pm$ 1.3	5.3 $\pm$ 1.4	7.4 $\pm$ 6.8	4.4 $\pm$ 0.6
Aspartic acid	3.5 $\pm$ 0.7	1.7 $\pm$ 1.0	3.0 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.9	2.0 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.8	2.6 $\pm$ 0.9	2.9 $\pm$ 1.3	2.7 $\pm$ 1.4
Threonine	4.4 $\pm$ 1.8	5.2 $\pm$ 1.0	5.2 $\pm$ 0.6	6.1 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.4	3.6 $\pm$ 1.6	3.2 $\pm$ 0.7	2.5 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.8
Serine	5.2 $\pm$ 0.8	5.5 $\pm$ 0.8	5.5 $\pm$ 0.9	6.3 $\pm$ 1.1	3.3 $\pm$ 0.5	3.3 $\pm$ 0.9	2.9 $\pm$ 0.8	3.5 $\pm$ 1.7	2.8 $\pm$ 0.3
Asparagine	1.7 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.5	1.5 (2)
Glutamine	25.2 $\pm$ 10.5	29.3 $\pm$ 20.2	28.2 $\pm$ 6.0	22.3 $\pm$ 1.3	20.7 $\pm$ 3.2	15.6 $\pm$ 9.5	20.2 $\pm$ 8.9	27.6 $\pm$ 6.2	20.1 (2)
Glutamic acid									
Proline	3.3 $\pm$ 1.5	3.7 (2)	3.2 $\pm$ 1.2	3.6 (2)	5.2 $\pm$ 0.6	8.6 $\pm$ 3.5	5.1 (2)	3.0 (2)	4.2 (2)
Glycine	18.2 $\pm$ 2.1	22.0 $\pm$ 1.3	18.6 $\pm$ 1.7	20.4 $\pm$ 3.6	17.1 $\pm$ 2.6	14.9 $\pm$ 3.2	19.5 $\pm$ 5.7	11.0 $\pm$ 2.3	17.0 $\pm$ 4.2
Alanine	9.4 $\pm$ 4.2	7.2 $\pm$ 3.2	6.6 $\pm$ 2.2	8.2 $\pm$ 4.0	11.1 $\pm$ 2.7	16.2 $\pm$ 7.8	13.7 $\pm$ 5.5	15.4 $\pm$ 7.3	19.1 $\pm$ 3.0
Citrulline									
Valine	2.3 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.7	2.2 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.8	2.5 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.8	3.1 $\pm$ 0.9	4.4 $\pm$ 1.7	2.7 $\pm$ 0.4
Cystine	2.0 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.8	2.3 $\pm$ 1.0	1.8 $\pm$ 1.4	2.6 $\pm$ 0.6
Methionine	0.6 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
Isoleucine	1.5 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2
Leucine	2.3 $\pm$ 0.8	2.9 $\pm$ 0.8	2.4 $\pm$ 0.6	2.4 $\pm$ 0.7	3.4 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 1.4	3.9 $\pm$ 0.8	3.1 $\pm$ 0.9	3.6 $\pm$ 0.3
Tyrosine	1.0 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 1.0	1.4 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 1.1	1.8 $\pm$ 0.3
Phenylalanine	1.3 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.7	1.1 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 1.2	2.5 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.4
Cystathionine	0.6 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.9	0.4 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.5	0.6 (2)	0.3 (2)	0.4 $\pm$ 0.0

Each amino acid value is expressed as percent of total amino acids

( ): Number of cases which are analyzed

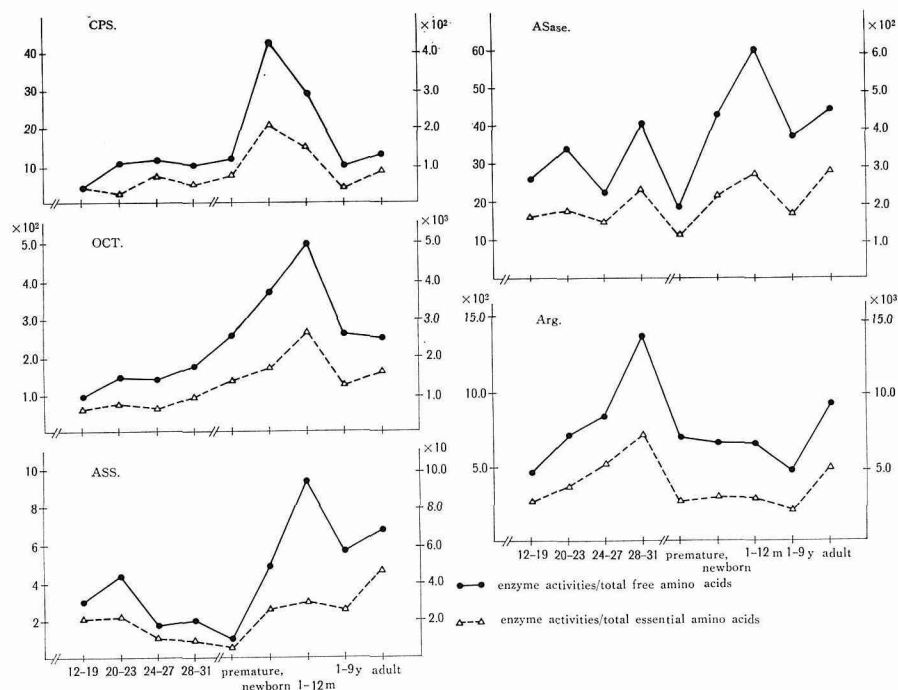


Fig. 11 relation of enzyme activities and amino acids

性値をそのまま反映するパターンを示した。尿素サイクルの基質となるオルニチン、アスパラギン酸、グルタミン酸の値と酵素活性量との関連性は認めることが出来なかった。

## 考 按

### I) 尿素サイクル酵素活性

アミノ酸分解過程で生じたアンモニアは最終的には、尿素合成系に入り、尿素として排出されることはすでに述べたが、文献的に動物実験では、主として rat および pig の肝を用いた尿素サイクル5つの酵素活性の胎仔期発達に関し、1959年 Kennan and Cohen<sup>13)</sup>により始めて詳細な検討がなされて以来、1960年代 Brown and Cohen<sup>8)</sup>、Schimke<sup>14)</sup> および Ratner<sup>15)</sup>の一連の研究が報告されている。成長の著しいヒト胎児肝の urea cycle 酵素活性は1961年 Kennan and Cohen<sup>16)</sup>が3例の胎児につき、始めて5つの酵素活性を測定し報告している。更に胎児期の発達過程に於ける系統的な活性測定としては、1968年 Colombo and Richterich<sup>17)</sup>は妊娠初期(在胎60日から110日胎児)を対象に ASS を除く4つの酵素および肝重量当たりの尿素量を測定し CPS, ASase, Arg とともに在胎50日と110日目に活性値の上昇を認め、妊娠初期における2峰性のピークを指摘し、妊娠初期での急激な胎児成長の反映と推定した。同じく1968年 Raihä ら<sup>18,19)</sup>が主に在胎

10週から20週迄の14例を中心に行った urea cycle 酵素活性測定結果を新生児、乳児、成人と比較し、さらに発達段階での胎児肝 slice を用い *in vitro* に生成された尿素量を比較し、在胎20週の胎児では、基質が充分量与えられるとき、尿素合成し得ることを報告した。今回著者は、胎生12週～31週までと従来報告されていない胎生期の酵素活性につき検討したが、その結果は、酵素活性値の平均では、5つの酵素共、各々独立に固有の発達形態を示した点、従来の報告と全く異なっていた。5つの酵素のうち、ASase のみは各群とも同じ活性値で月齢別、年齢別の差が認められなかった。逆に OCT は5つの酵素のうち、唯一の段階的発達パターンを示し、特に幼児期、学童期にピークを示した。ASS は律速酵素として5つの酵素の中でも、特に注目され、古くから研究されているが、rat を用いた実験<sup>20)</sup>では ASS は胎児期ほとんど活性を示さず、出生後24時間以内に急激な活性上昇を来し、成熟 rat の50%に達し、urea 排出の時期と広く一致するとして ASS 活性値を尿素生成の時期の目安としたが、著者の結果からは、在胎12週～19週、すでに小児期コントロールの50%の活性があり、かつ、各段階とも ASS 活性値の急激な上昇が認められない点、Raihä ら<sup>19)</sup>の報告とよく一致し、尿素生成の時期の目安とはなり得ない結果であった。また、佐藤、西塚<sup>21)</sup>は rat を用い <sup>14</sup>C-ラベル炭酸投与による尿素回路

中間体の挙動から、ASS にかわり CPS の方が律速酵素であると推定しており、著者の結果をあてはめた場合、胎生初期すでに 50% の活性を認め、ASS 同様 CPS のみの結果から尿素生成時期の目安とはなり得なかった。以上、CPS, OCT, ASS, ASase の 4 つの酵素に比し、Arg は胎児期すでに幼児、学童以上の活性があり、出生後はむしろ活性の低下を示し、他の 4 つの酵素とは異った特徴的なパターンを示した。Räihä ら<sup>19)</sup>の成績でも Arg 活性は在胎 20 週で成人 (100% とし) の 45% の値であり、出生後も 8 週で成人のほぼ 50% にとどまり、他の 4 つの酵素 (CPS, OCT, ASS, ASase) が生後 8 週で 70~80% 以上の活性に達するのに比し、Arg は低い値のままであった。動物実験でも Schimke<sup>22)</sup>, Asida and Haper<sup>23)</sup>の報告があり、やはり Arg に関しては、他の 4 つの酵素と異った変動を示すことを強調し、著者の結果でも特徴的な動向を示し、興味ある所見であった。次に ASS を 1 とした場合の相対的活性の系統的な検討は、いままでに報告されていない。

著者の図からも明らかなように、胎児期と出生後のパターンの違い、さらに尿素合成の最終段階である Arg の相対的活性の比較から、在胎月数に伴い有意の上昇が明らかとなり、胎児の体重が急激に上昇する時期に一致して尿素の合成を促進させるような結果が得られたが推測の域を脱しない所見であった。前述した Arg を除く 4 つの酵素活性値では、胎児期よりむしろ出生後の方が高い値を示したのと一見矛盾した結果であった。ただ、動物実験<sup>24)</sup>では、摂取窒素量の増加分はすべて尿素排出増加としてとらえることが可能とされ、ヒト胎児の場合も、母体由来の持続的窒素量の摂取増加の結果、尿素合成酵素群の相対的活性上昇をもたらしたとも考えられるが、生体内でのより複雑な因子、すなわち、個々のアミノ酸を分解する酵素の問題、生合成の問題、さらに、脱アミノ反応の量的問題が関与しているものと考えられる。さらに、小児期を 100% とし、5 つの酵素の百分比を Räihä らの成績と比較した結果では、在胎 20 週ですでに 5 つの酵素共 30% 以上の活性を認めたこと、および Arg は乳児期でも 50% 前後の値である点は Räihä ら<sup>19)</sup>の報告と類似していたが、CPS, ASS は Räihä ら<sup>19)</sup>によって示された段階的上昇はなく、著者の結果は、各段階での変動が多く、他の OCT, ASase, Arg に比し不安定な酵素とも考えられた。以上 urea cycle 酵素活性結果と従来の文献的記載に基づき、胎児腎における尿分泌の時期を推定してみた。機能的に妊娠 10 週で腎は尿分泌能力を有していると言われており、また Friedberg<sup>25)</sup>の報告では、胎生 2 カ月~3 カ月時すでに、羊水中に尿素が認められるが、母体血清中に相当する量と広く一致し、この時期での尿生成はなく、むしろ羊水中濃度が母体血清

中濃度をかなり上回る 6 カ月以降を尿生成の時期としているが、著者はむしろ Colombo ら<sup>17)</sup>, Räihä ら<sup>18)</sup>が指摘した在胎 12 週ですでに胎児自身による尿素の生成があり、一部胎盤を経て母体に、一部羊水中に排出され腎の特有な形態および構造が備わる妊娠 20 週以降羊水中に尿素が著明に上昇すると推定したが、さらに検討を要すると考えられた<sup>26~28)</sup>。

## II) アミノ酸定量分析について

1948 年 Christensen and Streicher<sup>29)</sup>は急激な成長をなす細胞内アミノ酸濃度の測定のため manometric ninhydrin 法を用い guinea pigs の胎仔と母体の骨格筋アミノ酸濃度および rabbit の胎仔と母体の骨格筋、心筋のアミノ酸濃度の測定結果より、胎仔側が母体側の 3~5 倍の高濃度を有していることを指摘した。guinea pigs, rabbit の胎仔および人間の胎児と母体間血漿中アミノ酸濃度の分析でも胎(仔)児側にアミノ酸が高濃度であることを指摘した。1966 年 Ryan and Carver<sup>30)</sup>は在胎 22 週~24 週のヒト胎児肝 5 例と成人肝 5 例の肝組織内遊離アミノ酸をアミノ酸自動分析法により測定した定量結果は、肝重量当たり遊離アミノ酸総量は胎児側が成人値より大であり、肝内アミノ酸組成も 21 種類のうち、バリンのみが成人肝に高濃度であり、タウリン、スレオニン、アラニン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロジン、フェニルアラニン、オルニチン、リジン、ヒスチジンが胎児側に有意に上昇し、この点は文献的に検討した結果(すなわち、胎児と母体血漿中のアミノ酸の関係)と広く一致することを示唆した。Ryan ら<sup>30)</sup>は 5 カ月という限られた時期の結果であるのに反し、今回の著者の系統的な測定結果からは、肝組織内蛋白量、および蛋白当たり遊離アミノ酸総量および必須アミノ酸総量は胎児期と出生後で明らかな差は認められず、アミノ酸総量に対する必須アミノ酸百分比が出生後僅かに高い傾向を示した。

成長の速い胎児では合成過程の亢進により、必須アミノ酸の取り込みも多いと考えられるが、石川<sup>31~33)</sup>がラット胎仔臍帯動脈差から得られた結果では、必須アミノ酸の胎仔による取り込みは比較的少なく、著者の胎児肝組織内必須アミノ酸量も少なく、石川の結果と類似した所見であった。また、アミノ酸組成に関しては Ryan ら<sup>30)</sup>の結果と異なり、出生後に高いのはメチオニン、アラニンであり、胎児側はタウリン、セリン、スレオニンが高い値であった。ただし著者は蛋白当たりの数値の比較であり、Ryan ら<sup>30)</sup>は、dl 中の量として表わしてある。また、著者の結果につき、文献的に報告された臍帯動脈差<sup>34~38)</sup>および羊水中アミノ酸組成<sup>39~41)</sup>の分析結果と比較検討したが、ヒト胎児肝組織、臍帯血、羊水とを関連づける結果を得るまでにい

たらず、肝組織内と血漿中アミノ酸量は必ずしも平行した値ではなかった。最後に尿素サイクル5つの酵素活性値と肝組織内遊離アミノ酸定量分析値との関連性は、従来報告はなく、著者の結果でも酵素活性値をそのまま反映しており、胎児期 urea cycle 酵素活性値は低いにもかかわらず、遊離アミノ酸の肝濃度が高値をとらないのは、胎児期に存在する酵素活性量で充分アンモニア処理がなされていることが示唆された。Ghadimi and Pecora<sup>42)</sup>の報告では、尿素サイクルの基質となる、アスパラギン酸、グルタミン酸、オルニチンは妊娠初期(在胎19週～25週)での臍帯血中濃度が母体血中の7～8倍の高値を示し、妊娠末期で、ほぼ母体血中と同値となり、他のアミノ酸に比し、尿素サイクルの基質としてのアミノ酸のみが高濃度である結果を得ているが、著者の結果では、むしろアスパラギン酸、グルタミン酸、オルニチンは胎生初期、末期および出生後の変動が認められず、血漿中<sup>43)</sup>と組織内では尿素サイクルの基質となるアミノ酸量は異った傾向を示すものと考えられる。

## 結 語

ヒト胎児期より成人にいたるまで系統的に行った、肝組織内尿素サイクル酵素活性測定値および遊離アミノ酸測定結果を詳細に検討し、以下のことが明らかとなった。

1) 5つの酵素活性値の平均は、胎児期にはOCT, Argは段階的活性上昇を示したが、CPS, ASSおよびASaseは変動がなく一定の値を示した。Arg以外の4つの酵素は出生後の方が胎児期より活性が高い値であったが、Argは在胎28週～31週に最高で、出生後はむしろ低下しており、この点従来報告がなく新知見と思われた。

2) ASSを1とした場合の尿素合成酵素群の相対的活性を比較した値は、胎児期と出生後で明らかなパターンの差異が認められ、特に胎児期、在胎12週～19週から在胎28週～31週に向け上昇傾向であり出生後は下降の傾向を示し、胎児期でのアミノ酸代謝亢進を推測させる結果を得た。

3) 5つの酵素活性の各月齢ごとの百分比より在胎12週～19週時、各酵素共、すでに小児期コントロールの30%以上の活性があり、肝でのurea生成はかなり早い段階で行われていることが推定された。5つの酵素のうち、Arg活性の動向は、他の4つの酵素と異なる動向を示した。

4) 肝組織内蛋白量、遊離アミノ酸量、および必須アミノ酸総量は胎児期と出生後の明らかな差は認めないが、遊離アミノ酸量に対する必須アミノ酸のしめる割合は出生後の方がやや高い傾向を示した。

5) 肝組織内遊離アミノ酸組成は胎児期グルタミン、グルタミン酸、グリシン、タウリンがアミノ酸総量の50～

60%であり、出生後はタウリンにかわり、アラニンが加わった。また、胎児期はタウリン、セリン、スレオニンが高く、メチオニン、アラニンは出生後の方に高く、他のアミノ酸は胎児期と出生後で差はなかった。

6) 尿素サイクル酵素活性値と肝組織内遊離アミノ酸定量分析値との関連性は、出生後に比し胎児期低い酵素活性を示すにもかかわらず、肝内アミノ酸量は高値を示さない結果より、胎児期の酵素活性量で充分にアンモニア処理はなされているものと考えられた。尿素サイクルの基質であるアスパラギン酸、グルタミン酸、オルニチンの値も、胎児期から出生後まで変動はみとめられなかった。以上の基礎データに基づき、胎生期、肝における各酵素の性状の変動、すなわち mutant enzyme が胎生各時期に存在するか否かを究明するために、さらには urea cycle 酵素と関連した先天代謝異常症の胎児期診断の一指標として今後役立つものと考えられる。

本論文の要旨は、第80回日本小児科学会(昭和52年札幌市)において発表した。

稿を終えるにあたり、実験および論文作成に際し、御教示いただきました当教室の大柳和彦講師、ならびに十川英明助手に深謝致します。

## 文 献

- 1) Ratner, S. and Petrac, P.: The mechanism of arginine synthesis from citrulline in kidney. *J. Biol. Chem.* **200**, 175-185 (1953).
- 2) Reichard, H.: Ornithine carbamyl transferase activity in human tissue homogenates. *J. Lab. Clin. Med.* **56**, 218-221 (1960).
- 3) Tedesco, A. T. and Mellman, W. J.: Argininosuccinate synthetase activity and citrulline metabolism in cells cultured from a citrullinemic subject. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **57**, 829-834 (1967).
- 4) Burnett, G. H. and Cohen, P. P.: Study of carbamyl phosphate ornithine transcarbamylase. *J. Biol. Chem.* **229**, 337-344 (1957).
- 5) Masshall, M. and Cohen, P. P.: Ornithine transcarbamylase from streptococcus faecalis and bovine liver. *J. Biol. Chem.* **247**, 1641-1653 (1972).
- 6) 荒島真一郎: 高アンモニア血症に関する研究—先天性尿素サイクル異常症. *最新医学* **27**, 730-740 (1972).
- 7) Ratner, S., Anslow, W. P. and Petrac, B.: Biosynthesis of urea by enzymatic cleavage of argininosuccinic acid to arginine and fumaric acid. *J. Biol. Chem.* **204**, 115-125 (1953).

- 8) Brown, G. W. and Cohen, P. P.: Comparative biochemistry of urea cycle enzymes in liver. *J. Biol. Chem.* **234**, 1769-1935 (1959).
- 9) Schimke, R. T.: Adaptive characteristics of urea cycle enzyme in the rat. *J. Biol. Chem.* **237**, 459-468 (1962).
- 10) Ratner, S.: Enzymatic synthesis of arginine (condensing and splitting enzymes). *Methods in enzymology*. II. 356-360, Acad. Press. Inc. New York. (1955).
- 11) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurment with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
- 12) Arakawa, T., Tamura, T., Tada K. and Hirano H.: Methionine and glycine levels in the liver of riboflavine deficient rats. *Tohoku J. Exp. Med.* **95**, 203-205 (1968).
- 13) Kennan, A. L. and Cohen, P. P.: Biochemical studies of the developing mammalian fetus. I Urea cycle enzymes. *Develop. Biol.* **1**, 511-525 (1959).
- 14) Schimke, R. T.: The importance of both synthesis and degradation in the control of arginase levels in rat liver. *J. Biol. Chem.* **239**, 3808-3817 (1964).
- 15) Ratner, S.: Coordinated changes in enzymes of the ornithine cycle. *Adv. Enzy.* **39**, 66-90 (1973).
- 16) Kennan, A. L. and Cohen, P. P.: Ammonia detoxication in liver from humans. *Proc. Soc. exp. Biol.* **106**, 170-173 (1961).
- 17) Colombo, J. P. and Richterich, R.: Urea cycle enzymes in the developing human fetus. *Enzym. Biol. Clin.* **9**, 68-73 (1968).
- 18) R ih , N. C. R. and Suihkonen, J.: Development of urea-synthesis enzymes in human liver. *Acta. Paediat. Scand.* **57**, 121-124 (1968).
- 19) R ih , N. C. R. and Schwartz, A. L.: Development of urea biosynthesis and factors influencing the activity of the arginine synthetase system in perinatal mammalian liver. *Inborn Errors of metabolism*. 221-237, Academic. Press. Inc. New York (1973).
- 20) R ih , N. C. R. and Suihkonen, J.: Factors influencing the development of urea-synthesizing enzymes in rat liver. *Biochem. J.* **107**, 793-797 (1968).
- 21) 佐藤 了, 西塚泰美編: 物質代謝とその調節 I. 現代生物化学 5 (1975).
- 22) Schimke, R. T.: Studies on factors affecting the levels of urea cycle enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem.* **238**, 1012-1018 (1963).
- 23) Ashida, K. and Harper, A. E.: Metabolic adaptations in higher animals. VI. liver arginase activities during adaptation to high protein diet. *Proc. Soc. Exph. Biol. Med.* **107**, 151-159 (1961).
- 24) 佐伯武頼: 尿素合成の条件と調節機構—臓器レベルによる観点から—. 蛋白質, 核酸, 酵素 **17**, 382-397 (1972).
- 25) Friedberg, V.: Untersuchungen uber die fetale urinbildung. *Gynecol.* **140**, 34-45 (1955).
- 26) 藤本 守: 腎とアンモニア. 代謝 **6**, 594-608 (1969).
- 27) Gresham, E. L., Simons, P. S. and Battaglia, F. C.: Maternal-fetal urea concentration difference in man: metabolic significance. *J. Pediat.* **79**, 809-811 (1971).
- 28) Briggs, S. and Freedland, R. A.: Effect of ornithine lactate on urea synthesis in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* **160**, 205-209 (1976).
- 29) Christensen, H. N. and Streicher, J. A.: Association between rapid growth and elevated cell concentration of amino acids. *J. Biol. Chem.* **175**, 95-100 (1948).
- 30) Ryan, W. L. and Carver, M. J.: Free amino acids of human foetals and adult liver. *Nature.* **212**, 292-293 (1966).
- 31) 石川榮治: 高等動物におけるアミノ酸代謝の生体像—高等動物のアミノ酸代謝をどのように捉えるか—. 化学と生物 **10**, 831-837 (1972).
- 32) 石川榮治: 哺乳動物におけるアミノ酸代謝の動態. 蛋白質, 核酸, 酵素 **19**, 191-201 (1974).
- 33) 石川榮治: 高等動物の *in vivo* におけるアミノ酸代謝—臓器の分担性と相関性—. 生化学 **46**, 1-21 (1974).
- 34) Prenton, M. A. and Young, M.: Umbilical vein-artery and uterine arterio-venous plasma amino acid differences. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth.* **76**, 404-411 (1969).
- 35) Felig, P., Kim, Y. J., Lynch, V. and Hendler, R.: Amino acid metabolism during stavation in human pregnancy. *J. Clin. Invest.* **51**, 1195-1202 (1972).
- 36) 林 進, 城戸国利, 山田順常, 渡辺扶美子: 早産未熟児と満期産成熟児の臍帯静脈血漿遊離アミノ酸値の比較. 医学のあゆみ **98**, 660-662 (1976).
- 37) 林 進, 城戸国利, 山田順常, 渡辺扶美子: ヒト胎児における窒素担体 (N-carrier) としてのアミノ酸について. 医学のあゆみ **98**, 788-790 (1976).
- 38) 林 進, 城戸国利, 山田順常, 渡辺扶美子: ヒト胎児のアミノ酸出納について—満期産新生児の生下時, 臍帯静脈および臍動脈血漿アミノ酸濃度差より—. 医

- 学のあゆみ **99**, 555-557 (1976).
- 39) Cockburn, F., Giles, M., Robins, S. P. and Forfar, J. O.: Free amino acid composition of human amniotic fluid at term. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth.* **80**, 10-18 (1973).
- 40) Dallaire, L., Potier, M., Melancon, S. B. and Patrick, J.: Fetomaternal amino acid metabolism. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth.* **81**, 761-767 (1974).
- 41) 福島和夫: 妊娠中のアミノ酸分析の診断的意義について. *日産婦誌* **27**, 228-234 (1975).
- 42) Ghadimi, H. and Pecora, P.: Free amino acids of cord plasma as compared with maternal plasma during pregnancy. *Pediatrics* **33**, 500-506 (1964).
- 43) Schimassek, H. and Gerok, W.: Control of the levels of free amino acids in plasma by the liver. *Biochem. Z.* **343**, 407-415 (1965).